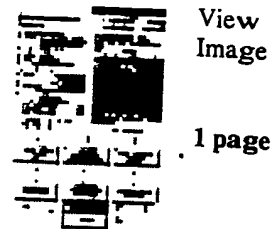


Title: **JP61204200A2: HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY AND ITS PREPARATION**

Country: **JP Japan**  
Kind: **A**

Inventor(s): **NOGUCHI HIROSHI**  
**OTSUKA HIROSHI**  
**NAKANISHI TORU**  
**NISHIMOTO TOSHIAKI**  
**OCHI HIROSHI**  
**KATO MASUHIRO**  
**OGINO SHIGEO**



Applicant/Assignee: **SUMITOMO CHEM CO LTD**  
News, Profiles, Stocks and More about this company

Issued/Filed Dates: **Sept. 10, 1986 / Sept. 26, 1984**

Application Number: **JP1984000201363**

IPC Class: **C07K 15/04; A61K 39/395; A61K 39/40; C12N 15/00; C12P 21/00; G01N 33/569; G01N 33/577; C12P 21/00;**

Priority Number(s): **Sept. 26, 1984 JP1984000201363**

Abstract: **NEW MATERIAL:**A human monoclonal antibody against exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa*, which is produced in vitro. **USE:** Remedy for infections caused by microorganisms including *Pseudomonas aeruginosa*, diagnostic reagent for infections by exotoxin-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **PREPARATION:** For example, human B lymphocyte which is capable of producing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxins is infected with EB viruses to produce the antibody against the exotoxins. Then, the cells are transformed into proliferative cells which can be subcultured and fused with myeloma cells using polyethylene glycol to give a hybridoma. Then, the hybridoma cells are cloned by the limiting dilution to give a monocloned hybridoma. Then, the cells are cultured to obtain human monoclonal antibody. **COPYRIGHT: (C)1986,JPO&Japio**



Family: **Show known family members**

Other Abstract Info: **CHEMABS 105(17)151400T DERABS C86-089359**

Foreign References: **No patents reference this one**



**Nominate this for the Gallery...**

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-204200

⑥ Int. Cl.<sup>4</sup>

C 07 K 15/04  
A 61 K 39/395  
39/40  
C 12 N 15/00  
C 12 P 21/00

識別記号

庁内整理番号

6464-4H  
8214-4C  
8214-4C  
7115-4B  
7235-4B

⑬ 公開 昭和61年(1986)9月10日

※審査請求 未請求 発明の数 7 (全19頁)

⑭ 発明の名称 ヒトモノクローナル抗体およびその製法

⑯ 特 願 昭59-201363

⑰ 出 願 昭59(1984)9月26日

⑱ 発 明 者	野 口	浩	宝塚市高司4丁目2番1号	住友化学工業株式会社内
⑱ 発 明 者	大 塚	浩 史	宝塚市高司4丁目2番1号	住友化学工業株式会社内
⑱ 発 明 者	中 西	徹	宝塚市高司4丁目2番1号	住友化学工業株式会社内
⑱ 発 明 者	西 本	俊 明	宝塚市高司4丁目2番1号	住友化学工業株式会社内
⑱ 発 明 者	越 智	宏	宝塚市高司4丁目2番1号	住友化学工業株式会社内
⑱ 発 明 者	加 藤	益 弘	宝塚市高司4丁目2番1号	住友化学工業株式会社内
⑱ 発 明 者	荻 野	重 男	宝塚市高司4丁目2番1号	住友化学工業株式会社内
⑲ 出 願 人	住友化学工業株式会社			大阪市東区北浜5丁目15番地
⑳ 代 理 人	弁理士 諸石 光 潤			外1名

最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

## 1. 発 明 の 名 称

ヒトモノクローナル抗体およびその製法

## 2. 特 許 請 求 の 範 囲

- (1) 緑膿菌外毒素に対する、ヒト体外で産生されたヒトモノクローナル抗体。
- (2) 緑膿菌外毒素に対する、ヒトモノクローナル抗体を少なくとも一種類含む免疫グロブリン製剤。
- (3) 緑膿菌外毒素に対する、ヒトモノクローナル抗体を少なくとも一種類含む細菌感染症治療剤。
- (4) 緑膿菌外毒素に対する、ヒトモノクローナル抗体を少なくとも一種類含む外毒素産生性緑膿菌感染症診断用の試薬。
- (5) 緑膿菌外毒素に対する抗体産生能を持つヒトリリンパ球B細胞に、EBウィルスを感染させることにより継代培養可能な増殖型細胞に形質転換させ、この形質転換細胞を増殖させ

て抗体を取得することを特徴とする緑膿菌外毒素に対するヒトモノクローナル抗体を製造する方法。

- (6) 緑膿菌外毒素に対する抗体産生能をもつヒトリリンパ球B細胞とミエローマ細胞とを細胞融合させることにより両細胞間のハイブリドーマを形成させ、このハイブリドーマを増殖させることによつて抗体を取得することを特徴とする緑膿菌外毒素に対するヒトモノクローナル抗体を製造する方法。
- (7) 緑膿菌外毒素に対する抗体産生能を持つヒトリリンパ球B細胞にEBウィルスを感染させることにより、緑膿菌外毒素に対する抗体を産生し、かつ継代培養可能な増殖型細胞に形質転換された細胞とミエローマ細胞とを細胞融合させることにより両細胞間のハイブリドーマを形成させ、このハイブリドーマを増殖させることによつて抗体を取得することを特徴とする緑膿菌外毒素に対するヒトモノクローナル抗体を製造する方法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、緑膿菌外毒素に対するヒトモノクローナル抗体、その製造方法およびその用途、すなわち具体的には緑膿菌を含む細菌による感染症の治療剤および外毒素産生性緑膿菌による感染症の診断用試薬に関する。

細菌感染症の治療において問題となる病原菌は、抗生物質の開発とともに変化している。すなわち、臨床上用いられる抗生物質の種類の変遷に伴ない細菌感染症を引き起こす細菌、いわゆる起炎菌が交代してきた。従来、低病原性又は弱毒性と言われた細菌、なかでも特に緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)による感染例が増加し、緑膿菌は近年、主要な病原菌の一つとなっている。緑膿菌感染は、免疫抑制剤の投与を受け免疫能の低下している患者、又は癌患者や熱傷患者および新生児などの免疫不全・低下症の患者において重篤な症状を引き起こし死に至らしめる場合が多い細菌感染として知られている。緑膿菌の病原性因子としては、細菌の増

ない。又、抗生物質療法の限界を示すその他の例は、抗生物質は細菌の増殖を抑制するものの、細菌が産生しその病原性を発揮する毒素や酵素に対して阻害効果の無いことである。

ところで、細菌由来の毒素や酵素を中和および阻害することにより細菌感染症を予防および治療することができる療法として、免疫グロブリン製剤の投与、いわゆる抗体療法があり、抗生物質療法と併用される、又はそれに代わるものとして注目されている。ウマやウサギ等の動物を能動的に免疫することによつて抗体価の高い血清を得ることができ、その血清を投与する抗体療法は、各種の動物を用いた実験的感染症において著効な治療効果を示すことが多くの実験にて実証されている。ヒト以外の動物由来の血清を用いた抗体療法がヒトにおいても有効性を示すことは、ジフテリア毒素や蛇毒の例で周知のことである。しかしながら、ヒト以外の動物から得られた異種蛋白をヒト体内へ移入する方法は、アナフィラキシーや、その他のア

レルギーに伴う内毒素および緑膿菌の産生する外毒素および外酵素がある。なかでも外毒素は、ほとんどの緑膿菌臨床分離株において産生されており、その外毒素は細胞に毒性を示すのみならず、各種の動物に致死的作用を及ぼす。

細菌感染を予防・治療する方法として、まず第一にあげられるのが、抗生物質および合成抗菌剤を用いた化学療法である。ストレプトマイシン、カナマイシン、ペニシリンやセファロスポリンなど幾多の抗生物質が開発され、その多くはブドウ球菌を代表とするほとんどのグラム陽性球菌や、大腸菌などのグラム陰性菌に感受性を示し、著効な臨床効果を示してきた。しかしながら、今日迄の多くの研究開発にもかかわらず、緑膿菌に感受性を示す薬剤は依然少ないのが現状であり、しかも、今日、感受性を示すとされる薬剤でも、そのほとんどが、緑膿菌に対してその増殖を単に阻害するいわゆる静菌的に作用するのみで、殺菌力に欠けており、臨床の場合において著効な治療効果を示すに至っていない。

アレルギー反応などの重篤な副作用を引き起こし一般細菌感染症の治療法として採用されるに至っていない。かくして、細菌および細菌由来の毒素・酵素に対して高い抗体力価を有し、細菌感染症の治療効果の大きいヒト免疫グロブリンの開発が望まれている。

従来のヒト免疫グロブリン製剤は、健常人又は細菌感染既応患者から血液を採取し、既知の方法にて免疫グロブリン画分を分取・精製した後、ポリエチレングリコール添加、蛋白分解酵素処理、スルホン化、DEAE-カラムクロマトグラフィー等の、凝集物を除去する方法により、筋肉注射用のみならず、静脈注射用に製剤化されたものである。これらヒト免疫グロブリン製剤には、ヒト以外の異種動物由来の免疫グロブリンを投与した時にみられるアナフィラキシー等の副作用は無い等の利点をもつが、幾つかの欠点を持つ。第一に、①細菌および細菌由来の毒素・酵素に対する抗体価が低く、必ずしも充分な治療効果を期待しえない。第二に、②

高力価の免疫グロブリンを大量に安定して供給することが難しい。健康人ボランティアや患者より採取された血液を材料に製造されており、高い力価の血清を一定して入手することは極めて難しく、製造ロット毎に、抗体価が変動することがある。第三に、④任意のヒトの血液を材料に製造されることにより、免疫グロブリン製剤にHBsウイルスなどの肝炎ウイルスやAdult T cell leukaemia virus (ATLV, HTLV)などが混入することがあり得る。

こうした状況に鑑み、本発明者らは前述の問題点を改善すべく、鋭意改良を加え、緑膿菌感染症、特に外毒素産生緑膿菌感染症に有効なヒトモノクローナル抗体、およびそれを含む高力価ヒト免疫グロブリン、およびそれを生体外またはマウスなどを含むヒト以外の生体内にて安定的かつ大量に製造する方法を確立し本発明を完成するに至った。

本発明者らは、緑膿菌外毒素に対するヒトの抗体、特に単一の抗原特異性をもつモノクロー

ンを選別し試験管内(生体外)にて連続的に細胞増殖し、かつ所望の特異抗体を連続的に生産する細胞株を樹立する。又、第二の方法として、緑膿菌および緑膿菌由来外毒素によって感作されたヒトリンパ球B細胞を骨髓腫細胞(myeloma)又はBリンパ芽球様細胞(B lymphoblastoid cell)と細胞融合することによって、試験管内にて連続的に細胞増殖し、かつ所望の特異抗体を連続的に生産する細胞株を樹立する。第三の方法として、第一の方法にて樹立された特異抗体を産生するEBウイルス形質転換細胞を骨髓腫細胞又はBリンパ芽球様細胞とを細胞融合することによって試験管内にて連続的に細胞増殖し、かつ所望の特異抗体を連続的に生産する細胞株を樹立する。これらの樹立株を試験管内培養又はヌードマウス腹腔などの生体内にて培養することによって、培地又は腹水へ分泌された抗体を精製することによって抗体を大量に製造する。

本発明によって得られる、緑膿菌外毒素に対

ナル抗体(単一性抗体)の生産方法に係わり、更に特定するに特異抗体を連続的に産生し得るヒト細胞株の取得方法およびその細胞を in vitro および in vivo 培養することを含む特異抗体の大量製造方法およびそれによって得られた緑膿菌外毒素に対する特異モノクローナル抗体を少なくとも一種類含む、感染治療用のヒト免疫グロブリン製剤、又は診断用試薬としてのヒトモノクローナル抗体に関するものである。

緑膿菌外毒素と特異的に反応するヒトモノクローナル抗体を連続的に産生するヒト細胞株が本発明によって取得される。第一の方法として、生体内又は生体外にて緑膿菌および緑膿菌由来の外毒素によって感作されたヒトリンパ球B細胞をエプスタイン・バー(Epstein-Barr)ウイルス(以下、EBウイルスと略)と混合することによって感染させ、連続的に増殖する細胞へと形質転換(transformation)させる。次いでクローン化する前の、又はクローン化された形質転換細胞から、所望の特異抗体産生株

するヒトモノクローナル抗体とは、緑膿菌外毒素分子の抗原決定基を特異的に認識する単一の(homogeneous)ヒト型の抗体を指す。本ヒトモノクローナル抗体は、緑膿菌外毒素に対して結合する能力(結合活性)、外毒素の細胞への侵入を阻害する活性、外毒素の毒素活性を阻害する活性(中和活性)をもち、外毒素産生性緑膿菌による感染症を治療することができる。更に外毒素産生性緑膿菌の分離鑑別に用いることができる。

本発明を以下、詳細に説明する。

抗原としての緑膿菌外毒素とは、外毒素A(Exotoxin A)(M.L. Vasil, D. Kabat and B.H. Iglewski, Infection and Immunity, 16, 358(1977)およびG.L. Gray et. al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2645(1984))に代表される、緑膿菌の産生する毒素を意味する。

本発明に含まれるヒトモノクローナル抗体の製造方法は、基本的に、以下の諸過程にわたる

ことができる。①抗原感作されたヒトリンパ球 B 細胞の調製、②無制限増殖能力の賦与によるモノクローナルな特異抗体産生細胞株の樹立、③モノクローナルな特異抗体産生細胞株の培養、④培養液からのモノクローナルな特異抗体の精製、⑤モノクローナルな特異抗体を含む高力価免疫グロブリン製剤の調製。順次、説明する。

ヒトのリンパ球 B 細胞とは、緑膿菌外毒素に対する抗体を産生するヒトリンパ系細胞で、主として末梢血液よりリンフォブレップ、モノボリ分離液などのリンパ球分離液を用いた遠心分離法によって分離されるが、各種疾患の診断および治療の目的で摘出されたリンパ節、脾臓などの臓器や臍帯血由来のリンパ球 B 細胞を材料に用いることもできる。緑膿菌による感染、特に外毒素産生性緑膿菌による感染症を患ったことがあり、生体内で感作された既応症のヒト由来のリンパ球 B 細胞を用いることが望ましい。あらかじめ、血清中の抗体価を測定することにより適切なリンパ球提供者を選別することがで

きる。又、別の方法として、緑膿菌症の有無を問わず、ヒトリンパ球 B 細胞を採取し、試験管内にて不活化された緑膿菌外毒素とを混合することによって感作せしめることができる。すなわち、抗原としての不活化緑膿菌外毒素をリンパ球 B 細胞に添加する。更にアメリカヤマゴボウレクチン (PWM) などの植物性レクチン、Cowan I などの菌体成分、又はヒトリンパ球の混合培養液や脾臓、胸腺細胞や臍帯血細胞培養液など、B 細胞増殖因子および B 細胞分化因子等のリンフォカイン類を含む溶液を同時に、又はそれぞれの組み合わせで添加することによって試験管内にて抗原感作し、引き続き抗体産生細胞へと増殖・分化させたヒトリンパ球 B 細胞を用いることができる。これらのヒトリンパ球 B 細胞は、その細胞表面に抗体分子を有し、ある限られた期間、少量の抗体を分泌することが可能であるが、無制限に増殖することはできないことを特徴とする。

抗原感作されたヒトリンパ球 B 細胞を無制限、

連続的に増殖可能な細胞株とする方法として、本発明は基本的に二種類の方法を含む。第一の方法は、抗原感作されたヒトリンパ球 B 細胞をマーマセット細胞 B 9 5 - 8 から調製された EB ウイルスと混合培養することによって EB ウイルスをリンパ球 B 細胞に感染させる。好ましくは、1細胞あたり  $2 \sim 10 \text{ T.D}_{50}$  のウイルスを混合する。96穴マイクロプレートの1ウエルあたり  $0.5 \sim 3 \times 10^4$  個の細胞を播種し、あらかじめ選別されたウシ胎児、ウシ、ウマ又はヒト等の血清を  $2 \sim 20\%$  (v/v) にて含む RPMI 1640 又は Eagle's MEM などの通常の培地を用いて  $5 \sim 10\%$   $\text{CO}_2$  存在下、 $32 \sim 37^\circ\text{C}$  にて、2～5週間培養することによって形質転換細胞 (transformed cell) を得る。培養中2～4日毎に培地を半量ずつ交換する。必要に応じて、マイコプラズマの汚染を防ぐ抗生物質や合成抗微生物薬を添加する。形質転換細胞は、感染10日以降、 $20 \sim 200$  個の細胞集団として光学顕微鏡下で観察され、

非形質転換細胞と容易に区別し得る。十分に増殖された形質転換細胞を含むウエル (well) の培養液を酵素免疫法 (ELISA) によって抗体価をスクリーニングして抗体産生の認められるウエルを選択する。その後、形質転換された細胞塊 (クラスター) を含む溶液をピペットを用いて軽く吸引・排出する操作を繰り返すことによってクラスターをはぐし、培地にて適切な細胞濃度に希釈し  $0.5 \sim 100$  個細胞/ウエルとなるように96穴マイクロプレートに播種培養する、いわゆる限界希釈法 (Limiting dilution method) を用いるか、又は軟寒天を利用してクローニングする。 $0.36 \sim 0.4\%$  (w/v) の軟寒天 (Sea plaque agarose が好ましい) に形質転換細胞約  $7 \times 10^4 \sim 7 \times 10^5$  個を培養プレート ( $30 \text{ mm } \phi$ ) へ接種し、 $5\%$   $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  にて培養する。1細胞から増殖してくるコロニーを得る。クローニングの際に、feeder layer としてマウス腹腔内細胞、ヒト臍帯血リンパ球又は X 線照射処理したマウス脾臓細胞を

用いることが望ましい。クローニングされた細胞株の培養上清の抗体価をE L I S A法にて測定し、特異抗体産生量の多い株を更に選別する。このクローニング、抗体の高産生株の選別を2～3回繰り返して、増殖の速い、かつ特異抗体を安定的、大量に産生する形質転換細胞株を選別し樹立する。

第二の方法は、抗原感作されたヒトリンパ球B細胞と骨髓腫細胞とをポリエチレングリコール(P E G)の存在下に細胞融合する方法である。用いられる骨髓腫細胞はP3×63-Ag 8(P3)、P3×63-Ag 8.653などの、マウス骨髓腫細胞由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HG P R Tと略)欠如変異株、又は、ヒト骨髓腫細胞U-266由来のHG P R T欠如変異株などを指す。骨髓腫細胞の代わりに、ヒトBリンパ芽球細胞由来のHG P R T欠如変異株を用いることもできる。P E Gとしては、P E G 1,000～6,000を30～50% (w/v)の濃度で用い

する。約10～20日間新しいH A T培地に、続いて約3～5日間ヒポキサンチン・チミジン含有培地(H Tと略)に、3日毎に半量ずつ交換を続け約2～3週間培養して、増殖してくるコロニー、いわゆるハイブリドーマを得る。HG P R T欠如変異株を用いることなく、代謝阻害剤を組み合わせるることによってハイブリドーマを選別することも可能である。ハイブリドーマの培養液の抗体価をE L I S A法又はラジオイムノアッセイ(R I Aと略)によって測定し、緑膿菌外毒素に対する特異抗体産生株を選別する。限界希釈法又は軟寒天法によって、2～3回クローニングを繰り返して、増殖の速い、特異抗体産生量の多い、安定した細胞株を得る。抗原感作されたヒトリンパ球B細胞の代わりに、第一の方法によってE Bウイルス形質転換された細胞を用いることもできる。

以上、E Bウイルス形質転換法(E B virus transformation method)又は細胞融合法(cell fusion method; hybridoma method)を

用いる。レクチン、ポリ-L-リジンやD M S Oなどを添加することにより融合効率を高めることもできる。P E Gの代わりに、センダイウイルス(H V Jウイルス)を用いることも可能である。融合方法は、マウス細胞同志を融合し、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得したKöhler and Milsteinらの方法(Nature 256, 495 1975)に準ずる。簡単に記述すれば、抗原感作されたヒトリンパ球B細胞とHG P R Tの欠如した骨髓腫細胞とを10～1:1の割合にて混合し、30～50% (w/v) P E G 6000を0.5～1分間に少量ずつ加え、1～10分間静置する。その後、5～10分間に10～50 mlの血清不含培地を加える。更に培地を加え $10^5 \sim 10^6$ 個細胞/mlの濃度に調製し、96穴マイクロプレートに1ウェルあたり $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞を播種する。翌日、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン含有培地(H A T培地と略)に半量交換し、5% CO<sub>2</sub>、32～37℃にて培養

用いて、抗原感作ヒトリンパ球B細胞より樹立された細胞株は、連続的に増殖することができると、しかも、特異抗体を安定的に、かつ大量に産生し得ることを特徴とする。

これら樹立された形質転換細胞又はハイブリドーマ( $0.5 \sim 5 \times 10^5$ 個細胞/ml)を通常の動物細胞培養用培地にてCO<sub>2</sub>インキュベーターを使用して2～10% CO<sub>2</sub>、32～37℃の条件のもとで培養フラスコやプレート等の容器内で静置培養又は回転培養する。特に大量に培養する時は、動物細胞用に設計されたジャーフェメンターやホロファイバーシステム等を用いることもできる。通常の動物細胞培養用培地とは、ウシ胎児、仔ウシ、ウシ、ウマおよびヒトなどの血清を2～20%含有するR P M I 1640、Eagle's M E Mに代表される培地、又は、インシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレナイト、ウシアルフミン、リビドなど細胞の増殖に必要な微量成分を含む無血清培地を指す。上記の試験管内細胞培養以外

に、形質転換細胞、又はハイブリドーマをヌードマウスなどの動物体内へ接種することによって細胞を腹腔などの体内にて培養することも可能である。マウスやヌードマウスの場合、1匹あたり  $0.5 \sim 2.5 \times 10^7$  個の細胞を腹腔内投与する。この場合、細胞接種前に、プリスタンや抗アシアロGM1抗体を投与することが望ましい。X線照射や摘脾手術も有効の場合がある。

抗体の精製は通常の生化学的手法を組み合わせてることによってなされる。すなわち、硫酸沈澱分画法、エタノール沈澱分画法、PEG分画法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、電気泳動法等である。精製過程において、凝集物の形成や抗体活性の低下を防ぐ工夫が必要である。例えば、ヒト血清アルブミン(HSAと略)を0.05~2%の濃度で添加する。その他グリシンやα-アラニンなどのアミノ酸類、特にリジン、アルギニンやヒスチジンの塩基性アミノ酸、グルコースや

マンニトールなどの糖類、塩化ナトリウムなどの塩類を添加することが好ましい場合がある。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られている。 $\beta$ -プロピオニラクトンや無水酢酸などで処理することは、凝集を阻止することができ静脈内投与も可能とする。

精製されたヒトモノクローナル抗体は、生物学的製剤の製剤化に通常用いられる方法によって製剤化される。基本的には、メンブレンフィルター等による濾過除菌操作の後に、安定化剤とともに滅菌バイアルに凍結乾燥される。

本ヒトモノクローナル抗体製剤は、細菌感染治療・予防剤として、緑膿菌外毒素に対する1種類のヒトモノクローナル抗体より成ることも可能であるが、更に好ましくは、緑膿菌外毒素分子の異なる抗原決定部位を認識しうる、少なくとも2種類又はそれ以上のヒトモノクローナル抗体と混合して用いられる。又は緑膿菌外毒素以外の緑膿菌由来抗原、例えばエラスターゼ、プロテアーゼなどの緑膿菌外酵素や外膜蛋白・

内毒素構成成分などを認識する、従来型のヒト抗体と混合して使用される。更には、緑膿菌以外の細菌、ウイルス、真菌、原虫、癌細胞に対するヒト抗体に、本発明によって得られる緑膿菌外毒素に対するヒトモノクローナル抗体を添加して用いることができる。従来のヒト免疫グロブリン製剤に、本発明によって得られるヒトモノクローナル抗体を添加して、外毒素に対する高力価免疫グロブリン製剤とされる。

本発明によって得られるヒトモノクローナル抗体は、主としてクラスIgGおよびIgMに属するがこれに限定されたものでない。本ヒトモノクローナル抗体は、緑膿菌外毒素に対して結合する(結合活性)。その結合定数として  $10^8$  モル/l以上の高い結合親和性をもつことが望ましい。その他、外毒素の細胞への侵入を阻害する活性、外毒素の酵素活性を阻害する活性(中和活性)をもち、外毒素産生性緑膿菌による実験的マウス感染症を治療することができる。

外毒素産生性緑膿菌による感染症および、そ

の細菌を含む混合細菌感染症の治療・予防に用いられる時、本ヒトモノクローナル抗体を少なくとも1種類含むヒト免疫グロブリン製剤は、重症の場合成人あたり1回1~10g、予防や通常の治療の場合成人あたり1回0.2~5gが投与される。

以上、詳しく述べたように、本発明によって得られる緑膿菌外毒素に対するヒトモノクローナル抗体は、同抗原に対して高い抗体価を有し、マウス実験的感染症の系で従来の免疫グロブリン製剤よりも、はるかに優れた治療効果を示すことが、第一の特徴である。その他、ヒト由来の蛋白であることより、異種蛋白の投与時にみられるアナフィラキシー等の副作用の少ないことが期待されるし、特定の細胞より生産・精製される抗体であることより、不特定多数のヒト血液より製造された従来の免疫グロブリン製剤にくらべ、未知のバイオハザードが混入してくる可能性の低いことが特徴である。又、本モノクローナル抗体の製造方法としては、生体外で

大量に、高力価の特異抗体を安定して製造することが特徴であり、従来のヒト血液より製造する方法にくらべ高力価など生物活性の点で、安定的供給ができるなど品質管理の点で優れる。

以上、本発明の基本となるものである。

次に実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれのみに限定されないことは言うまでもない。

#### 実施例 1

EBウイルス形質転換法によるヒトモノクローナル抗体産生株の樹立(1)

(1) EBウイルス溶液の調製およびそのウイルス価の検定

EBウイルスを産生放出しているマーマセット細胞B95-8を、ウシ胎児血清(以下FCSと略)を容量比として10%含有するRPMI 1640培地に $6.5 \times 10^5$ 細胞/mlの割合にて懸濁し、培養フラスコT-75(Corning #25110)を用いて5%CO<sub>2</sub>37℃の条件のもと4日間静置培養した。培

倍系列希釈されたEBウイルス溶液を20μlずつ添加し5%CO<sub>2</sub>、37℃にて培養した。3日毎に1/3容量の培地を交換し3週間後、光学顕微鏡を用いて形質転換された細胞像の有無を調べた。各希釈段階あたり6ウェルを用いて試験し形質転換率を求めた。50%の細胞を形質転換するに要する最高希釈度を各希釈段階の形質転換率からReed and Muench法にて推計学的に求めその中のウイルス量を1TD<sub>50</sub>とし逆算して元の試料中のウイルス量をTD<sub>50</sub>数で表わした。ウイルス量 $10^5 \sim 10^7$ TD<sub>50</sub>/mlのEBウイルス液を得た。

(2) ELISAによる抗緑膿菌外毒素抗体価の測定

抗緑膿菌外毒素抗体価の測定はS. J. Cryz, E. Fürer, R. Germainerの方法(Infection and Immunity, 40, 659, (1983))に準じて行なった。すなわち5μg/mlの濃度で0.1M重曹緩衝液(pH 9.6)に溶解した緑膿菌外毒素溶液を96ウェルマ

イコンを採取し低速遠心機(トミー精工RS-20BH)を用いて2,000rpm(ローターTS-7)、10分間遠心分離し、およびそれに引き続いてその上清を0.45μmノンプレンフィルター(マイレクス8LHA0250S)にてろ過した。そのろ液をセラムチューブ(住友ベークライトMS-4505)に分注し、-80℃に保存、必要時適宜溶解しヒトリンパ球のEBウイルスによる細胞形質転換(トランスフォーメーション)の実験に用いた。EBウイルス溶液のウイルス価はヒト末梢血リンパ球を指示細胞としてD、J、Moss and J、H、Popeの方法(J. general Virology, 17, 283 (1972))に準じて行なった。すなわち16%FCS含有RPMI 1640培地に懸濁されたヒト末梢血リンパ球( $10^6$ 細胞/ml)を96ウェルマイクロプレート(住友ベークライト)に1ウェルあたり100μlずつ分注した。その後 $10^0 \sim 10^7$ の範囲にて前述の培地にて10

マイクロプレート(ファルコン#8912、以下マイクロプレートと略称する)に1ウェルあたり100μlずつ分注し、37℃にて2時間インキュベートし外毒素をマイクロプレートに吸着させた。

マイクロプレートから外毒素溶液を除去した後3%ウシ血清アルブミン(以下BSAと略称する)含有リン酸緩衝液pH 7.2(組成NaCl(8g/l)KCl(0.2g/l)Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O(2.9g/l)およびKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.2g/l))(PBSと略)を1ウェルあたり120μlずつ分注し37℃にて30分間インキュベートすることにより外毒素の未吸着部分をブロッキングした。マイクロプレートを抗原吸着プレートとして以後の操作に用いた。必要に応じてこの段階で-20℃に保存した。アッセイ前に抗原吸着プレートを0.05%Tween 20含有PBS(以下PBSTと略)で3回洗滌した。その後1%BSA含有PBSTを1ウェルあたり50μl分注、



必要に応じ1% BSA含有PBS Tで適宜希釈した試料(血清腹水又は培養上清)を1ウェルあたり50  $\mu$ l加え、37℃で2時間インキュベートした。その後試料を除去し、PBS Tで3回洗滌した。続いて第2抗体液を1ウェルあたり100  $\mu$ lずつ加え、37℃で2時間インキュベートした。第2抗体として1% BSA含有PBSで500~1,000倍希釈したホスファターゼ標識アフィニティ精製抗ヒト免疫グロブリン抗体(Kirkegaard & Perry Lab. Inc.)を用いた。IgG、IgM抗体価の測定にはそれぞれホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgM抗体を用いた第2抗体を除去し、PBS Tで8回洗滌後、発色基質溶液(3 mg p-ニトロフェニルリン酸-2-ナトリウム塩を1 mlのNa<sub>3</sub>(0.2 mg/1 ml) MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O(0.1 mg/ml)を含む10% ジエタールアミン緩衝液pH 9.1に溶解した水溶液)を1ウェルあたり100  $\mu$ lずつ加え、37℃で反応させ

た。45分間反応後、3N NaOHを1ウェルあたり20  $\mu$ lずつ加えることにより反応を停止した。反応後のOD<sub>405</sub>をマルチスキャン(Titertek)で測定した。

### (3) リンパ球提供者の選別

29名のヒトより末梢血を採取し、分離された血清試料の抗緑膿菌外毒素抗体価を前述のELISA法で測定した。その結果の一部を表1に示す。5試料で抗外毒素IgG抗体価が高く、そのうち1試料では抗外毒素IgM抗体価も比較的高かった。

表1 ヒト血清の抗緑膿菌外毒素抗体価

血 清	抗体価 (OD <sub>405</sub> )	
	IgG	IgM
No 1	> 2.0	0.2
No 2	0.1	0.2
No 3	2.0	0.3
No 4	0.1	0.1
No 5	1.8	0.1
No 6	1.6	0.1
No 7	> 2.0	0.1
No 8	0.4	0.1
No 9	0.2	0.1
No 10	0.4	0.1
コントロール	0.5	0.1
(陰性)	± 0.8	± 0.1

### (4) ヒト末梢血からのリンパ球の調製

血清中の抗緑膿菌外毒素抗体が高かったヒトNo 1の末梢血100 mlを採取した。遠心管

(住友ベークライト、50 ml容積)に15 mlのモノポリ分離液(Flow Lab.)を入れ、その上に更に末梢血20 mlを静かに重層した。低速遠心機(トミー精工RS-20BH)を用い2,500 rpm(ローターTS-7)で室温15分間遠心分離し赤血球とリンパ球を分離した。リンパ球を含む部分を回収し、10% FCS含有RPMI 1640培地(以下培地と略)で2回洗滌した後、細胞数を計算した。その結果 $1.2 \times 10^5$ ヶのリンパ球を得た。

### (5) EBウイルス形質転換法による抗緑膿菌外毒素抗体産生株の樹立

ヒトNo 1末梢血リンパ球 $2 \times 10^7$ 細胞を2 mlの培地に懸濁し前述のEBウイルス液10 ml(ウイルス量 $10^7$  T<sub>D50</sub>/ml)を加え5% CO<sub>2</sub>、37℃にて2時間インキュベートした。その後低速遠心機(トミー精工RS-20BH)を用い2,000 rpm(ローターTS-7)で10℃、2分間遠心分離しEBウイルスの感染したヒトリンパ球を回収した。EBウイ

ルスの感染したヒトリンパ球を  $1.0 \times 10^6$  牛胎児血清およびペニシリン ( $100 \text{ IU/ml}$ )、ストレプトマイシン ( $50 \mu\text{g/ml}$ )、ポリミキシン ( $25 \mu\text{g/ml}$ )、スペクチノマイシン ( $20 \mu\text{g/ml}$ )、アルギニン ( $0.2 \text{ mg/ml}$ ) を含む培地 (Mycoplasma Cocktail, Bradley, et. al. 5th International Congress of Immunology, Kyoto, 1983; 以下MPCと略) に懸濁し (約  $2 \times 10^5$  細胞/ $\text{ml}$ )、あらかじめマウス腹腔内浮遊細胞 ( $3 \times 10^4$  細胞/ウェル) を入れておいたマイクロプレートに1ウェルあたり  $100 \mu\text{l}$  ずつ播種した。培養一週間後から3日毎に半量ずつ新鮮なMPCと交換し3週間後に細胞の増殖を観察した。培養したすべてのウェルでEBウィルス形質転換細胞の増殖が認められた。更に培養上清に含まれる抗外毒素抗体価を前述のELISA法にて測定した。その結果1/960の割合で抗外毒素IgG抗体価の高いウェルを認めた (FK-5A5)。培養上清には  $2 \mu\text{g}$

#### ーナル抗体産生株の樹立(2)

実施例1のごとくEBウィルス液の調製、ELISAを用いたアッセイ、ヒト末梢血リンパ球の調製を行なった。又、EBウィルstransフォーメーションによる抗緑膿菌外毒素抗体産生株の樹立も基本的には実施例1と同じ方法で行なった。すなわちヒト $\text{H}1$ 末梢血リンパ球  $9.0 \times 10^6$  ケの細胞とウィルス価  $10^7$  TD $50/\text{ml}$  のウィルス液  $5 \text{ ml}$  とを混合させることによって感染させ、マイクロプレートに1ウェルあたり  $1.8 \times 10^4$  ケの細胞を播種し、実施例1のごとく培養した。培養12日後に  $100 \%$  のウェルで細胞の増殖が認められ1/480の割合で抗緑膿菌外毒素抗体価の高いウェルが得られた。得られた細胞株FK-001は抗体価を低下することなく安定的に抗緑膿菌外毒素抗体を産生した。産生された抗体のクラスはIgMであった。

#### 実施例3

ヒト・マウス細胞融合によるヒト抗緑膿菌

$\text{ml}$  のヒトIgGが含まれ50倍希釈した $\text{H}1$ の血清と同程度の抗体価を示した。

#### (6) クローニング

抗外毒素抗体価の高かったウェルの細胞集団の一部をとり、 $10^3$  細胞/ $\text{ml}$  の割合にてMPCに懸濁し、あらかじめマウスの腹腔内浮遊細胞 ( $3 \times 10^4$  細胞/ウェル) を入れておいたマイクロプレートに1ウェルあたり  $100 \mu\text{l}$  ずつ播種しクローニングを行なった。培養5日目より3日毎に半量ずつ新鮮なMPCと交換した。3週間後に培養上清に含まれる抗外毒素抗体価を測定した。培養3週間後には96ウェル中68ウェルで形質転換細胞の増殖が認められた。そのうち抗外毒素抗体価の高いウェルが3つ、比較的高いウェルが6つ得られた。同様に抗体価の高いウェルの細胞を用い、更に繰り返し安定して抗外毒素抗体を産生する細胞株FK-5A5を樹立した。

#### 実施例2

EBウィルス形質転換によるヒトモノクロ

#### 外毒素モノクローナル抗体産生株の樹立

(1) ラジオイムノアッセイ (RIA) 法による抗緑膿菌外毒素抗体価の測定法

96ウェルマイクロプレート (Falcon #3912) を洗滌し、1ウェルあたり  $200 \mu\text{l}$  の  $3 \%$  BSAを含むPBSを添加後37℃、30分間インキュベートした。次に  $3 \%$  BSAを含むPBSを除去し37℃、10分間乾燥後PBSにて3回洗滌した。洗滌後  $1 \%$  BSAを含むPBSにて希釈した培養上清又は腹水  $50 \mu\text{l}$  と  $1 \%$  BSAを含むPBSにて希釈した  $^{125}\text{I}$  標識緑膿菌外毒素 (約20,000 cpm)  $50 \mu\text{l}$  を各ウェルに添加し37℃2時間インキュベート後、4℃にて一夜静置した。翌日さらにPBSにて希釈したウサギ抗ヒトIgM (G) 抗血清 (MILES-YEDA #65-066抗IgG, #65-067抗IgM)  $50 \mu\text{l}$  を各ウェルに添加し37℃1時間攪拌後、さらに  $1 \text{ mg/ml}$  のゼラチン、 $0.02 \%$  のNaN $_3$  を含むPBSに懸濁した

Protein A-Sepharose (Pharmacia) 20  $\mu$ l を各ウェルに添加し4℃1時間で攪拌した。攪拌後、マイクロプレートを用いて1,500  $\times$   $\eta$ にて10分間遠心した。遠心後、上清の半量を除き代わりに5 mM EDTA、1 mg/ml セラチン、0.02 % NaN<sub>3</sub>、150 mM NaCl を含むトリス塩酸バッファー(50 mM、pH 7.5、以下洗滌バッファーと略す)を各ウェルに添加した。再び遠心後、上清の半量を洗滌バッファーにて交換した。この操作を3～5回繰り返した後、各ウェルを分離してγ-カウンターにより放射エネルギーを計測した。

### (2) 抗原感作されたヒト末梢血リンパ球の調製

実施例1-(3)および1-(4)において述べた要領にてヒトの末梢血よりリンパ球B細胞を調製した。

### (3) 細胞融合

MOPC-2.1ラインに由来しHGPRT (ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシ

した。最後にEagle's MEMを約20 ml加えた後400  $\times$   $\eta$ にて7分間遠心した。遠心後ペレットを15 % 牛胎児血清、2 mM L-グルタミン、1 mM ビルビン酸ナトリウムを含む150 mlのRPMI 1640培地又はMPCに懸濁し1ウェルあたり $6.7 \times 10^4$ ケのミエローマ細胞となるよう96ウェルマイクロプレート(Falcon # 3040)に分注した。同時にfeeder layerとして $5 \times 10^5$ /mlとなるようマウスBALB/c脾臓細胞を各ウェルに添加した。このマイクロプレートを5 % CO<sub>2</sub>、37℃にて培養し翌日より2～3日ごとにHAT選択培地にて半量を培地交換した。融合約2週間後、増殖のみられたウェルの培養上清についてELISA(実施例1-(2))又はRIA(実施例3-(1))により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べた。その結果の一部を表2に示す。その中から抗体価の比較的高いウェル中の融合細胞(ハイブリドーマ)を拡大培養すると同時に限界希釈法

ルトランスフェラーゼ)を欠如するマウスBALB/cミエローマ細胞、P3  $\times$  63-Ag8U1(Marguillies et. al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 41, 781 (1976))をRPMI 1640培地(含10 % 牛胎児血清)又はMPCで継代しておき、そのうち $10^7$ ケの細胞をEagle's MEMにて3回洗滌した。一方、実施例1-(4)に記載されたモノホリ分離液に代えて、リンホブレップ(Nyegaard)にて分離したヒト末梢血リンパ球 $1 \sim 5 \times 10^7$ ケの細胞をEagle's MEMにて3回洗滌し $10^7$ ケのミエローマ細胞を遠心管(Corning # 25330)内にて混合して400  $\times$   $\eta$ で7分間遠心しペレットとした。このペレットに1 mlのPEG # 6,000(45 % Eagle's MEM溶液、KOH-CH-LIGHT)を約30秒かけて遠心管を回転しつつ添加し室温にて3分間静置した。次にEagle's MEMを1分間に2 mlの割合で遠心管を回転しつつ添加しこれを7回繰り返

(limiting dilution)によりクローン化した。約2週間後、クローンの培養上清について同様の方法により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べ最終的に4種のクローンを得た。

表2 ハイブリドーマ培養上清の抗緑膿菌外毒素抗体価

#### (1) クローニング前

ウェル	抗体価(cpm)	ウェル	抗体価(cpm)
1 A 1 1	5 4 0	2 H 6	1,0 5 6
1 B 4	5 1 6	3 B 1 0	6 6 1
1 E 6	1,0 1 4	3 F 6	1,0 0 0
1 E 9	9 2 7	3 F 8	8 2 4
1 F 9	2,4 2 8	3 G 4	5 9 4
1 G 1 2	5 5 0	3 G 8	5 1 8
2 B 8	5 4 0	4 B 1	1,5 0 6
2 D 1	4 1 0	4 G 4	9 5 7
2 G 1 0	5 0 6	4 G 6	1,4 0 5

## (2) クローニング後

クローン	抗体価 (cpm)
1 F 9 - 1 E 3	7 1 4
1 H 2	9 9 1
2 A 4	6 9 8
2 A 1 2	7 9 6
2 B 4	1, 0 6 2
3 G 8 - 2 A 9	6 9 0
3 E 1 1	6 7 5
3 F 1 1	8 3 1
4 G 6 - 1 C 1 0	7 6 9
1 C 1 2	1, 7 6 7

RIAによる測定、詳しい方法は、実施例3- (1) に記載。

(4) 細胞の拡大培養、抗体の調製および抗体価の測定

得られたクローン化ハイブリドーマ及びクローン化前の抗体産生性ウェル中のハイブリドーマを *in vitro* で培養し、培養上清を得

ハイブリドーマ由来腹水中の抗体が緑膿菌外毒素に対して特異的に反応することをRIA (実施例3- (1)) を利用した拮抗阻害実験によって確認した。実施例3- (1) に述べられたごとく、BSAをあらかじめ吸着させた96ウェルマイクロプレート (Falcon # 3912) を洗滌後、1% BSAを含むPBSにて希釈した腹水50  $\mu$ l、1% BSAを含むPBSにて希釈した一定量の<sup>125</sup>I 標識緑膿菌外毒素 (約20,000 cpm) 50  $\mu$ l および1% BSAを含むPBSにて希釈した各々の濃度の無標識緑膿菌外毒素10  $\mu$ l を各ウェルに添加し37℃で2時間インキュベート、その後4℃にて一夜静置した。その後実施例3- (1) に述べられたごとくウサギ抗ヒトIgM (G) 抗血清、Protein A-Sepharose を順次添加、インキュベート、遠心分離、洗滌後、抗原抗体結合物の放射能を計測した。ハイブリドーマ3F6由来の腹水中抗体の例を表4に示す。無標識抗原の同時添加により拮抗阻害が

ると共に約10<sup>7</sup>ケのハイブリドーマをブリストン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) で前処理したヌードマウスの腹腔内に注射することによって *in vivo* で培養し、腹水を採取し、RIA (実施例3- (1)) にて抗体価を調べた。その結果の一部を表3に示す。ハイブリドーマ3F6由来の腹水は対照のミエローム細胞P3U1由来の腹水よりも有意に高い抗体価を示した。

表3 ハイブリドーマ由来腹水の抗緑膿菌外毒素抗体価

抗体希釈度	抗体価 (cpm)		
	3F6	1E6	P3U1(コントロール)
1:3	2,428	603	627
1:18	2,274	960	750
1:108	1,848	795	877
1:648	1,292	614	—

RIAによる測定。実施例3- (1) を参照。

## (5) 抗体の特異性

みられ、本抗体が緑膿菌外毒素と特異的に反応することが示された。

表4 ハイブリドーマ3F6由来腹水の抗体の特異性

拮抗物質としての外毒素量 ( $\mu$ g)	抗体価 (cpm)
0	2,310
0.1	931
1	853
10	700

バックグラウンド値は650~750 cpm。

## 実施例4

ヒト・ヒト細胞融合によるヒト抗緑膿菌外毒素モノクローナル抗体産生株の樹立

PGLC33Hライン由来HGPRT (ヒポキサンチン・クアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ) を欠如するヒトリンパ芽球様細胞NC0467.3 (Chiorazzi et al., J. Exp. Med. 156, 930 (1982)) をRPMI 1640培地 (含10%牛胎児血清) で継代しておき、そのうち10<sup>7</sup>ケの細

胞を実施例3に述べたハイブリドーマ作製と同じ方法にて $1 \sim 5 \times 10^7$ ケのヒト末梢血リンパ球と融合させた。融合約3週間後増殖のみられたウェルの培養上清についてE L I S A (実施例1-(2))又はR I A (実施例3-(1))により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べ抗体産生性ウェル中のハイブリドーマについて限界希釈法 (limiting dilution) によりクローン化した。約3週間後クローンの培養上清について同様の方法により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べ抗体産生性クローンを得た。

#### 実施例5

E B ウィルス形質転換細胞を用いた細胞融合

実施例1および2のごとくE B ウィルスにて形質転換した抗体産生性ヒトリンパ芽球様細胞株 $1 \sim 5 \times 10^7$ ケの細胞を用いヒト・マウスハイブリドーマ作製(実施例3)又はヒト・ヒトハイブリドーマ作製(実施例4)と

(Corning # 25110)にて5% CO<sub>2</sub>、37℃、3日間培養して得られた培養上清を15%牛胎児血清、2 mM L-グルタミン、1 mM ビルビン酸ナトリウムを含むR P M I 1640倍地を等量ずつ混合し、さらに0.25 ~ 2.5 µg/mlのアメリカヤマゴボウレクチン(P W M)、0.001%のCowan Iおよび100 ng/mlの不活性化緑膿菌外毒素を添加した培地に $10^7$ /mlとなるようヒト末梢血リンパ球を加え10 mlを培養フラスコT-75 (Corning # 25110)にて5% CO<sub>2</sub>、37℃4日間培養した。培養後、遠心により試験管内免疫法により抗原感作されたヒト末梢血を分離し、その $1 \sim 5 \times 10^7$ ケの細胞を用いてヒト・マウスハイブリドーマ作製(実施例3)又はヒト・ヒトハイブリドーマ作製(実施例4)と同じ方法にてマウスミエローマ細胞、又はヒトリンパ芽球様細胞と融合させた。融合約2~3週間後、増殖のみられたウェルの培養上清についてE L I S A (実

同じ方法にてマウスミエローマ細胞又はヒトリンパ芽球様細胞を融合させた。但しハイブリドーマ培養液には1 µMのウアバインを追加した。融合約2~3週間後、増殖のみられたウェルの培養上清についてE L I S A (実施例1-(2))又はR I A (実施例3-(1))により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べ、抗体産生性ウェル中のハイブリドーマについて限界希釈法 (limiting dilution) によりクローン化した。約2~3週間後クローンの培養上清について同様の方法により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べ抗体産生性クローンを得た。

#### 実施例6

試験管内免疫法による抗原感作リンパ球の調製および細胞融合実験

25人のヒトの血液から調製されたヒト末梢血リンパ球を混合し(各々 $2 \times 10^6$ ケの細胞)、50 mlのR P M I 1640倍地(含10%牛胎児血清)を加えて培養フラスコT-75

実施例1-(2))又はR I A (実施例3-(1))により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べ、抗体産生性ウェル中のハイブリドーマについて限界希釈法 (limiting dilution) によりクローン化した。約2~3週間後、クローン化された細胞の培養上清について同様の方法により抗緑膿菌外毒素抗体産生の有無を調べ抗体産生性クローンを得た。

#### 実施例7

特異抗体の精製

E B ウィルスによつて形質転換され、抗緑膿菌外毒素抗体産生株として樹立されたF K - 001細胞を10% F C S 含有R P M I 1640培地にて培養した。その培養上清330 ml(蛋白質量750 mg)を50%飽和硫酸にて沈殿させ、その後0.2 M NaCl 含有0.1 M トリス-塩酸緩衝液pH 8.0に対して透析した。透析液10 mlをSephadex G-200カラム(直径2.5 cm、長さ85 cm、容量417 ml)に負荷し、0.2 M NaCl 含有0.1 M トリ

スー塩酸緩衝液 pH 8.0 にて溶出した。このゲルを過にて蛋白として3つのピーク (IgM、IgG、アルブミン画分) が得られ、抗緑膿菌外毒素抗体活性は IgM 画分のみに回収された。蛋白の回収率は3%で、比活性は約8倍上昇した。

#### 実施例 8

ウェスタンブロット法による抗原特異性の解析

緑膿菌外毒素 3.5  $\mu$ g および、分子量測定マーカー用蛋白 13.2  $\mu$ g (フォスホリラーゼ b 1.5  $\mu$ g、BSA 1.9  $\mu$ g、卵白アルブミン 3.3  $\mu$ g、炭酸脱水素酵素 1.9  $\mu$ g、大豆トリプシン抑制剤 1.8  $\mu$ g、 $\alpha$ -ラクトアルブミン 2.8  $\mu$ g の混合物) を SDS/ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ゲルをトランスバッファー (2.5 mM トリス・192 mM グリシン pH 8.3、20% (v/v) メタノール) に 4℃ 一夜浸漬した。次いでニトロセルロース膜 (Biorad) へ電気的 (30 V、4.5 h)

0.05% Tween 20 含有 TBS (pH 8.0) で5回洗滌後、発色試薬 (0.5 mg/ml クロロナフトール、20% メタノール、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む TBS、pH 7.5) を添加し発色させた。その結果、緑膿菌外毒素を電気泳動したレーンでは血清 (①)、FK-001 培養上清 (②) およびその精製 IgM (③) との反応において、分子量 68~72 K 付近に発色したバンド 1 本のみを認めた。FK-006 培養上清 (④) との反応においては、全く発色がみられなかった。又、分子量測定用マーカー蛋白を電気泳動した場合は、いずれの抗体とも反応せず、発色がみられなかった。このことは FK-001 抗体が特異的に緑膿菌外毒素と反応していることを示す。

#### 実施例 9

抗体による緑膿菌外毒素中和活性

マウス BALB/C 3T3 細胞を  $2.0 \times 10^5$  細胞/ml の割合で 10% FCS 含有 RPMI 1640 培地に懸濁し、96 ウェルマ

に、室温にてトランスファーし、2% BSA 含有 0.9% NaCl 加 50 mM トリス、塩酸緩衝液 pH 8.0 (TBS と略) で室温、1 時間インキュベートすることによりブロッッキングした。更に 0.1% BSA、10% FCS 含有 TBS で室温、1 時間インキュベートすることによりブロッッキングされたニトロセルロース膜を ① 血清 (ELISA 法にて抗緑膿菌外毒素抗体活性のあるヒト血清)、② 抗緑膿菌外毒素抗体産生細胞株 FK-001 培養上清、③ FK-001 培養上清より精製された IgM 画分、④ EB ウィルス形質転換細胞株 HI-006 培養上清、の各々の水溶液を 37℃ 1 時間、続いて 4℃ 一夜インキュベートした。0.05% Tween 20 含有 TBS (pH 8.0) でニトロセルロース膜を 5 回洗滌した後、第 2 抗体 (1% BSA、0.05% Tween 20 含有 PBS にて 3,000 倍希釈されたペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリン抗体) と 37℃ 1 時間インキュベートした。同様に

マイクロプレート (住友ベークライト MS-3096 F) に 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ播種して 5% CO<sub>2</sub>、37℃ にて 48 時間培養した。その後、FK-5A5、FK-001、HI-006 等の EB ウィルス形質転換モノクローナル抗体産生細胞株の培養上清を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 加えた。同時に緑膿菌外毒素 (10~300 ng/ml) を 1 ウェルあたり 10  $\mu$ l 添加した。5% CO<sub>2</sub>、37℃ にて 24 時間培養後、<sup>3</sup>H-ロイシン (10  $\mu$  Ci/ml) を含む培地へ全量交換し更に 2 時間培養した。細胞を PBS、次いで 0.02% EDTA 含有 PBS で洗滌し、更に 0.25% トリプシン溶液で細胞をプレート表面よりはがし細胞を浮遊させた。細胞を 5% トリクロ酢酸 (TCA) で 4℃ インキュベート、洗滌する操作を 3 回繰り返すことにより、可溶性 <sup>3</sup>H-ロイシンを抽出除去した。TCA 不溶性画分に取り込まれた <sup>3</sup>H 量を液体シンチレーションカウンター (ベックマン) で測定し

た。その結果を表5に示す。EBウイルス形質転換された抗緑膿菌外毒素抗体産生株のうちFK-5A5の培養上清は、緑膿菌外毒素による細胞毒性を強く中和した。又、FK-001培養上清も弱いながら中和活性を示した。

表5 培養上清による緑膿菌外毒素中和活性

外毒素 (ng/ml)	酸不溶性画分に取り込まれた <sup>3</sup> H (dpm)			
	培養上清			10% FCS- RPMI1640
	FK-5A5	FK-001	HI-006	
0	5.372	5.171	5.160	8,290
0.1	6.890	4.928	3.858	4,402
0.8	5.659	1,052	778	714
1	3,498	410	283	182
8	588	142	135	119

## 実施例10

抗体によるマウス実験的緑膿菌感染症の治療効果

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PA-103(外

表6 マウス実験的緑膿菌感染症における治療効果

抗体	投与量/マウス	生存匹数/供試匹数
FK-001	2 $\mu$ g	5/5
	0.4	0/5
市販イムノグロブリン製剤	1,000	5/5
	200	2/5
BSA	5,000	2/5

毒素A産生株)  $10^6$  細胞を封入した、ミリボア製ディフュージョンチェンバー(ミリボアフィルター0.45  $\mu$ m ポアサイズ、外径14mm、内径10mm、厚さ2mm)を、ICR-slcマウス(4~5週令、雄、1群5匹)の腹腔内に植え込んだ。チェンバー内で増殖した細菌より定常的に外毒素Aが分泌される。チェンバー植え込み直後に、ヒトモノクローナル抗体産生株FK-001の培養上清より精製されたIgM(FK-001抗体精製品と略)、市販ヒトイムノグロブリン製剤又は、BSAをそれぞれ静脈内投与し、5日後のマウスの生存率をもって治療効果を判定した。その結果を表6に示す。FK-001抗体精製品2  $\mu$ g/マウス投与群では全例が生残し、市販ヒトイムノグロブリン製剤1  $\mu$ g/マウス投与群に匹敵する治療効果を示した。

第1頁の続き

⑤ Int. Cl. 4

G 01 N 33/569  
33/577

//(C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

7906-2G  
7906-2G

手続補正書(自発)

昭和59年10月31日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和59年 特許願 第201363号



2. 発明の名称

ヒトモノクローナル抗体およびその製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪市東区北浜5丁目15番地

(209) 住友化学工業株式会社

代表者 土方 武

4. 代理人

大阪市東区北浜5丁目15番地

住友化学工業株式会社内

弁理士(8597) 諸 石 光 照

連絡先 TEL (06) 220-3404



5. 補正の対象

明細書の発明の名称の欄

6. 補正の内容

明細書第1頁第3行目の

「ヒトモノクローナル抗体およびその製法」を

「ヒトモノクローナル抗体およびその製法」と

訂正する。

以 上



手続補正書(自発)

手続補正書(自発)

昭和~~59~~<sup>60</sup>年~~10~~<sup>3</sup>月~~20~~<sup>4</sup>日

昭和60年11月6日

特許庁長官 殿

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

昭和59年 特許願 第201363号

## 1. 事件の表示

昭和59年 特許願 第201363号

## 2. 発明の名称

ヒトモノクローナル抗体およびその製法

## 2. 発明の名称

ヒトモノクローナル抗体およびその製法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪市東区北浜5丁目15番地

(209) 住友化学工業株式会社

代表者 土方 武

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪市東区北浜5丁目15番地

(209) 住友化学工業株式会社

代表者 土方 武

## 4. 代理人

大阪市東区北浜5丁目15番地

住友化学工業株式会社内

弁理士(8597) 諸 石 光 照

連絡先 TEL(06)220-3404

## 4. 代理人

大阪市東区北浜5丁目15番地

住友化学工業株式会社内

弁理士(8597) 諸 石 光 照

連絡先 TEL(06)220-3404

## 5. 補正の対象

明細書全文

## 6. 補正の内容

明細書の浄書(内容に変更なし)

## 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

## 6. 補正の内容

明細書の発明の詳細な説明の欄を下記のとおり訂正する。

(1) 明細書(昭和59年10月30日付け手続補正書にて提出した浄書明細書)第7頁、下から2行目

「本発明者らは」とあるを「本発明は」と訂正する。

(2) 同第8頁第1行目

「係わり、」とあるを「係わる。」と訂正する。

(3) 同第3行目

「取得方法および」とあるを「取得方法、」と訂正する。

(4) 同第4行目

「および」を「又は」と訂正する。

(5) 同第5行目

「大量製造方法および」を「大量製造方法、」と

訂正する。

(6) 同第8行目

「又は」を「および」と訂正する。

(7) 同第12行目

「第一の方法として、」とあるを「第一の方法として、以下の方法が挙げられる。」と訂正する。

(8) 同13行目

「および」を「又は」と訂正する

(9) 同第9頁第3行目

「又、第二の方法として、」とあるを「第二の方法は以下のとおりである。」と訂正する。

(10) 同第4行目

「および」を「又は」と訂正する。

(11) 同第10行目

「第三の方法として、」とあるを「第三の方法として、次の方法が挙げられる。」と訂正する。

(12) 同第12行目

「Bリンパ芽球様細胞とを」とあるを「Bリンパ芽球様細胞と」と訂正する。

(13) 同下から4行目

「培養することによって」とあるを「培養し」と訂正する。

(14) 同第12頁第3行目

「毒素とを」とあるを「毒素」と訂正する。

(15) 同第8行目

「又は」を削除する。

(16) 同第9行目~10行目

「混合培養液や脾臓、胸腺細胞や脾臓血細胞培養液など、」とあるを「混合培養液、脾臓細胞、胸腺細胞又は、脾臓血細胞の培養液又は、」と訂正する。

(17) 同11行目

「溶液を」とあるを「溶液などを」と訂正する。

(18) 同第14頁下から7行目

「好ましい」に」とあるを「好ましい」2 m ℓに」と訂正する。

(19) 同頁下から6行目～5行目

「 $\sim 7 \times 10^5$  個を培養プレート(30 mm  $\phi$ )へ接種し、」とあるを「 $\sim 7 \times 10^5$  個を混合し、あらかじめ0.5%寒天3 m ℓにて基層の作られた培養プレート(30 mm  $\phi$ )へ重層・固定し、」と訂正する。

(20) 同第15頁第11および12行目を以下のとおり訂正する。

「る。用いられる骨髓腫細胞はP3X63-Ag8U1(P3U1)、P3X63-Ag8.653などの、マ」

(21) 同第17頁第1行目

「HAT培地に、」とあるを「HAT培地を用いて、」と訂正する。

(22) 同第3行目

「(HTと略)に」とあるを「(HTと略)を用いて」と訂正する。

(23) 同頁下から3行目と4行目の間に以下の文章を挿入する。

「その場合、EBウイルス形質転換細胞と、HGPRTの欠如した骨髓腫細胞とを5～0.2:1の割合にて混合し細胞融合することが望ましい。」

(24) 同第21頁第1行目

プレート(Falcon#3040)に分注した。

同時に、feeder layerとして $5 \times 10^5$ /m ℓとな

るようにマウスBALB/C脾臓細胞、及び $1 \times 10^5$

/m ℓとなるようにマウスBALB/C腹腔内浮遊

細胞を各ウエルに添加した。5%CO<sub>2</sub>、37℃

にて培養し翌日より2～3日毎に、 $1 \mu\text{g}/\text{m} \ell$

Azaserine、 $100 \mu\text{M}$  Hypoxanthine、 $0.5 \mu\text{M}$

Quabainを含むHAz-Quabain選択培地にて

半量を培地交換した。融合約3週間後、増殖のみ

られたウエルの培養上清について、ELISA(実

施例1-2)により抗緑膿菌外毒素抗体産生性の有

無を調べた。

その結果の一部を表5に示す。抗体価の高いウエ

ル(5G8)中の融合細胞を、拡大培養すると同時

に限界希釈法(limiting dilution)によりクローン

化した。約2週間後、クローンの培養上清につい

て同様の方法により、抗緑膿菌外毒素抗体産生性の

有無を調べた。その結果の一部を表6に示す。

最終的に、FK001と同様のヒトIgM抗緑膿菌

外毒素抗体を安定に生産する2種のクローン5G8

-A8、5G8-E11を得た。

「認識する、従来型のヒト」とあるを「認識する従来型  
のヒト」と訂正する。

(25) 同第4行目

「するヒト抗体に、」とあるを「する従来型のヒト  
抗体に、」と訂正する。

(26) 同第15行目

「モル/ℓ」とあるを「ℓ/モル」と訂正する。

(27) 同第25頁第3行目

「3日毎に1/3」とあるを「3日毎に1/2」と  
訂正する。

(28) 同第43頁下から8行目から次頁の第13行目を  
以下のように訂正する。

「実施例5

EBウイルス形質転換細胞を用いた細胞融合

実施例2のごとくEBウイルスにて形質転換し  
た抗緑膿菌外毒素抗体産生性ヒトリンバ芽球様細

胞株FK001  $0.5 \times 10^7$ 個の細胞を用い、

ヒト・マウスハイブリドーマ作製(実施例3)と

同様の方法にてマウスミエローマ細胞株P3・NS

-1・1-Ag4-1(NS-1)  $2.5 \times 10^7$

個の細胞と融合させた。

融合させた細胞は、10%牛胎児血清を含む100 m ℓ

のMPCに懸濁し、1ウエルあたり $5 \times 10^4$ 個の

ミエローマ細胞となるように96ウエルマイクロ

表5 細胞融合後

培養上清中の抗緑膿菌外毒素抗体価

ウエル	抗体価 (O D 405)
2 C 2	0.10
2 F 3	0.11
2 H 1 2	0.12
4 C 3	0.10
5 A 8	0.26
5 B 9	0.24
5 C 8	1.03
5 H 7	0.19
5 H 8	0.18
5 H 1 0	0.20

表6 クローニング後

培養上清中の抗緑膿菌外毒素抗体価

ウエル	抗体価 (O D 405)	ウエル	抗体価 (O D 405)
A 2	0.06	C 5	0.08
A 4	1.25	D 1	0.07
A 8	1.04	D 8	0.69
A 9	0.21	D 9	0.08
B 1 1	0.99	E 1	0.05
C 1	0.14	E 3	0.04
C 3	0.25	E 4	0.03
E 7	0.04	F 1 0	0.05
E 1 1	0.79	G 2	0.21
F 5	0.07	G 4	0.80
F 6	0.75	H 1	0.60
F 7	0.49	H 7	0.06

(29) 同第45頁第5行目

「培地を」とあるを「培地と」と訂正する。

(30) 同第9行目

「した培地に」とあるを「した。この培地に」と訂正する。

(31) 同第46頁第10行目

「特異抗体の精製」とあるを「特異抗体の精製およびその性状の解析」と訂正する。

(32) 同第47頁第6行目と7行目の間に以下の文章を挿入する。

「精製されたFK-001抗体を2-メルカプトエタノールで還元しSDS/12.5%アクリルアミドゲルにて電気泳動をしたところ84-86K(H鎖)および25-29K(L鎖)付加にバンドを認めた。ゲル透過のデータを考慮に入れるとFK-001抗体のみかけ分子量は950~1150Kダルトンと計算された。又、精製されたFK-001

1抗体を2-メルカプトエタノールで還元し、SDS/12.5%アクリルアミドゲルにて電気泳動後、常法によりニトロセルロース(Schleicher & Suchueil)にトランスファーし、アルカリフォスファターゼ標識抗μ、γ重鎖抗体(Kirkegaard & Perry Laboratory, Inc.)およびアルカリフォスファターゼ標識抗K、λ軽鎖抗体(E.Y. Laboratories Inc)とそれぞれ反応させた。

所謂ウエスタン プロテイングにより、FK-001標品は抗μおよびK鎖抗体とのみ反応した。

すなわち、FK-001抗体はIgM(μ、K)である。」

(33) 同50頁第9行目

「添加した。5%」とあるを「添加した。外毒素処理された3T3細胞は、5%」と訂正する。

(34) 同第51頁第1行目および7行目

「表5」を「表7」と訂正する。

(35) 同第52頁第14行目

「表6」とあるを「表8」と訂正する。

(36) 同53頁第1行目

「表6」とあるを「表8」と訂正する。

以上

手 続 補 正 書

昭和61年2月21日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和59年 特許願 第201363号

2. 発明の名称

ヒトモノクローナル抗体およびその製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
大阪市東区北浜5丁目15番地  
(209) 住友化学工業株式会社  
代表者 土方 武

4. 代 理 人

大阪市東区北浜5丁目15番地  
住友化学工業株式会社内  
弁理士(8597) 諸 石 光 憲  
連絡先 TEL (06) 220-3404

5. 補正命令の日付

昭和61年2月18日(発送日)

6. 補正の対象

昭和60年11月6日付提出の手續補正書  
の補正の内容の欄

7. 補正の内容

補正の内容の欄の(1)を別紙のとおりに訂正する。

(1) 明細書(昭和60年3月4日付提出の手續補正書  
にて提出した浄書明細書)第7頁、下から2行目  
「本発明者らは」とあるを「本発明は」と訂正する。

以上